

**СОЗДАНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ,
СПЕЦИФИЧНЫХ К CD20**

Т.Н. Беловежец

Научный руководитель: к.б.н. А.А. Горчаков
Новосибирский государственный университет,
Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 1, 630090
Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН,
Россия, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8/2, 630090
E-mail: ochotanya@gmail.com

**DESIGN AND COMPARATIVE ANALYSIS OF CD20-SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN
RECEPTORS**

T. N. Belovezhec

Scientific Supervisor: Ph.D. A.A. Gorchakov
Novosibirsk State University,
Russia, Novosibirsk, Pirogov str., 1, 630090
Institute of Molecular and Cell Biology SB RAS
E-mail: ochotanya@gmail.com

Abstract. *Despite many advances in target therapies, survival of patients with rALL remains dismal, particularly among adults. Nonetheless, adoptive transfer of T-cells expressing chimeric antigen receptors (CARs) specific for the surface B cell molecule CD19 has been shown to be highly successful, as 50-90% of rALL patients receiving this therapy have achieved spectacular and durable remissions. This has inspired several research groups to develop CARs recognizing alternative B-cell targets, such as CD20, CD22, and BCMA, so as to use them in patients with other B-cell malignancies or help the patients that are unlikely to respond to CD19CAR T-cell therapy. Currently, there are two CD20-specific CARs in clinical trials. These CARs are based on the sequences of murine monoclonal antibodies Leu16 and 1F5 and use distinct hinge, transmembrane and signaling modules. Although both of these CARs appear to work, their side-by-side comparisons or structural optimization have never been performed in vitro or in vivo. The goal of our project was to design a CD20-specific CAR based on the human monoclonal antibody 2F2 (ofatumumab) and to compare this CAR to Leu16- and 1F5-based CARs in a unified context.*

Введение. Во всем мире ситуация с тяжелыми онкогематологическими заболеваниями, такими как рецидивирующий или резистентный острый лимфобластный лейкоз и В-клеточные неходжинские лимфомы, по-прежнему остается достаточно серьезной. Эти заболевания поражают пациентов всех возрастов, и если у детей вероятность благоприятного исхода достаточно высока даже после одного рецидива, то у взрослых шансов на выздоровление гораздо меньше. В последние годы с развитием адоптивной Т-клеточной терапии в области гематоонкологии произошел настоящий прорыв: от 50 до 90% пациентов с рецидивирующими и устойчивыми формами В-клеточных неоплазий, получившие терапию CD19 специфичными CAR Т-клетками, полностью излечиваются. Многими группами ведется

разработка CAR (химерных антигенных рецепторов), узнающих альтернативные В-клеточные мишени, например, CD20, CD22, BCMA – как для терапии других онкозаболеваний В-клеточного генеза, так и для помощи тем пациентам, кому введение CD19CAR Т-клеток не показано. В частности, в клинических испытаниях сейчас находятся два CD20-CAR, основанных на последовательностях мышиных антител Leu16 и 1F5 и отличающихся структурой используемых модулей. Тем не менее, пока не проведено систематических исследований, которые бы позволяли судить об относительной эффективности этих CD20-CAR, или были бы направлены на их структурную оптимизацию.

Целью данной работы было создание CD20-специфичного CAR на основе человеческого моноклонального антитела офатумумаб (2F2) и сравнение эффективности *in vitro* этого CAR и опубликованных CD20CAR (Leu16 и 1F5).

Экспериментальная часть. Для того чтобы корректно сравнивать эффективность различных CD20-специфичных CAR, было необходимо получить лентивирусные конструкции, кодирующие CAR, отличающиеся лишь антигенраспознающими модулями. В качестве основы для получения таких конструкций был использован лентивирусный вектор pCDH (CD530, SystemBio, США). На его основе нами были получены 6 лентивирусных конструкций, кодирующих три различных CD20-специфичных CAR “первого” и “второго” поколений (отличающихся наличием дополнительной костимулирующей последовательности). В качестве антигенраспознающих модулей в этих конструкциях были использованы последовательности scFv, заимствованные от человеческого антитела 2F2 (офатумумаб), а также мышиных антител 1F5 и Leu16.

Для проверки функциональности полученных CAR мы использовали две клеточные модели: человеческую Т-клеточную линию Jurkat и NK-клеточную линию YT. Выбор этих клеточных линий был обусловлен прежде всего тем, что обе эти линии легко трансдуцируются. Линию Jurkat традиционно используют для первичной выбраковки заведомо нефункциональных CAR, поскольку клетки этой линии крайне чувствительны к специфической и неспецифической активации. Однако эти клетки, в отличие от первичных Т-клеток или NK-клеточных линий, не проявляют значимой цитотоксичности. Поэтому для поэтапной характеристики полученных CAR-конструкций было решено провести анализ активационных свойств CAR на модели Jurkat, а цитотоксических свойств – на модели клеток линии YT.

Полученные лентивирусные конструкции, кодирующие CAR «первого» и «второго» поколений, были ко-трансфицированы в клетки линии HEK 293T вместе со вспомогательными плазмидами pMD2.G и psPAX2. В результате нами были получены 6 препаратов лентивирусных частиц, псевдотипированных VSV-G. Этими препаратами были трансдуцированы клетки линии Jurkat (CAR первого поколения) и линии YT (CAR второго поколения). Об эффективности заражения мы судили по экспрессии флуоресцентного репортера sorGFP и она составила >90% (Jurkat) и ~30% (YT). Затем мы убедились в том, что полученные CAR выходят на поверхность клеток Jurkat и YT: для этого мы провели их окрашивание конъюгатами против с-туса, поскольку этот эпитоп присутствует в структуре всех тестируемых CAR.

Был проведен активационный тест: в нем был измерен уровень экспрессии раннего маркера активации, белка CD69, на поверхности CD20-специфичных CAR-Jurkat клеток до и после инкубации с CD20+ клетками линии Raji. Как и ожидалось, клетки Jurkat, несущие CAR на своей поверхности успешно и специфически активировались.

Для того чтобы выяснить, проявляют ли полученные CAR-ΥT клетки специфическую цитотоксическую активность, эти клетки были смешаны с клетками-мишенями (Raji) в различных соотношениях. После 4-часовой совместной инкубации при помощи FACS-анализа был установлен процент гибели клеток-мишеней.

Результаты. Были получены 6 лентивирусных конструкций, кодирующих все комбинации модулей CAR: три различных CD20-специфичных scFv и два варианта сигнальных последовательностей. Используя эти конструкции, получены лентивирусные частицы и проведена трансдукция Т-клеток линии Jurkat и NK-клеток линии ΥT. В присутствии CD20+ клеток-мишеней, но не CD20- клеток, происходила специфическая активация клеток CD20CAR Jurkat. Более того, CD20CAR-ΥT клетки специфически лизировали клетки-мишени.

Заключение. Данные эксперименты свидетельствуют о том, что все полученные CD20-специфические CAR функциональны. Тем не менее, необходимо отметить, что 2F2(CD20)-CAR - созданный нами впервые – характеризуется наиболее удачным соотношением уровней специфической и неспецифической активации *in vitro*, что делает его более предпочтительным кандидатом для дальнейших испытаний на мышиных моделях.